

METHOD FOR DNA SEQUENCING

Patent Number: ☐ EP1055736
Publication date: 2000-11-29
Inventor(s): HAYASHIZAKI YOSHIHIDE (JP)
Applicant(s): HAYASHIZAKI YOSHIHIDE (JP); RIKEN (JP)
Requested Patent: ☐ WO9937808
Application Number: EP19990901132 19990122
Priority Number(s): WO1999JP00223 19990122; JP19980010471 19980122
IPC Classification: C12Q1/68
EC Classification: C12Q1/68D, C12Q1/68E
Equivalents: ☐ CA2318760, JP11206400, ☐ US6294337
Cited patent(s): WO8907149

Abstract

A method for sequencing a target DNA fragment in which along with amplification of the target DNA fragment, nucleic acid transcripts are generated using an RNA polymerase and the amplified target DNA fragments are used as templates in the presence of terminators for nucleic acid transcription reaction and the generated nucleic acid transcripts are analyzed, characterized in that the amplification of target DNA fragments and the generation of nucleic acid transcripts are carried out at a constant temperature is disclosed. The amplification of target DNA fragments and the generation of nucleic acid transcripts can be carried out around the room temperature. A DNA sequencing method using a novel method in which without using a thermo-resistant RNA polymerase, the amplification of target DNA fragments and generation of nucleic acid transcript can be carried out simultaneously in parallel is provided.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO99/37808 (43) 国際公開日 1999年7月29日(29.07.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00223 (22) 国際出願日 1999年1月22日(22.01.99) (30) 優先権データ 特願平10/10471 1998年1月22日(22.01.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama, (JP) (71) 出願人 ; および (72) 発明者 林崎良英(HAYASHIZAKI, Yoshihide)[JP/JP] 〒305-0061 茨城県つくば市稲荷前22-1-201 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 塩澤寿夫, 外(SHIOZAWA, Hisao et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHOD FOR DNA SEQUENCING (54)発明の名称 DNAの塩基配列決定方法 (57) Abstract A method for determining the base sequence of a target DNA fragment which comprises amplifying the DNA fragment while forming a nucleic acid transcript by using an RNA polymerase with the use of the thus amplified DNA fragment as a template in the presence of a nucleic acid transcript terminator, and then analyzing the nucleic acid transcript thus obtained, wherein the amplification of the target DNA fragment and the formation of the transcript are effected isothermally. The amplification of the target DNA fragment and the formation of the transcript are effected at around ordinary temperature and the target DNA fragment can be amplified by the strand replacement/amplification method. According to this novel method, a DNA can be sequenced by effecting the amplification of the target DNA fragment and the formation of the nucleic acid transcript at the same time without resort to any thermostable RNA polymerase.		

標的DNA断片を増幅させつつ、増幅された標的DNA断片を鋳型としてRNAポリメラーゼにより、核酸転写反応のターミネーターの存在下、核酸転写物を生成させ、生成した核酸転写物を解析することで標的DNA断片の塩基配列を決定する方法であって、上記標的DNA断片の増幅と核酸転写物の生成とを等温下で行う方法を開示する。標的DNA断片の増幅と核酸転写物の生成とは常温付近で行われ、標的DNA断片の増幅は鎖置換増幅法により行うことができる。耐熱性のRNAポリメラーゼを用いることなしに標的DNAの増幅と核酸転写物の生成とを同時並行して行える新たな方法を利用したDNAの塩基配列決定方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN キニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW キニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR キリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CF チャット	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	

明細書

DNAの塩基配列決定方法

技術分野

本発明は、鎖置換増幅法を利用する塩基配列決定方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、鎖置換増幅法を利用することで、温度の昇降をすることなしに標的DNA断片の増幅と塩基配列決定のためのリボヌクレオチド断片の調製とを並行して行える、RNAポリメラーゼを用いる塩基配列決定方法に関する。

背景技術

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法は優れた方法であり、年々その利用範囲が広がっている [Randall K. Saiki et al. (1988) Science 239, 487-491]。PCR 法では、1分子の DNA 断片を増幅することも可能である。PCR 法で増幅した生成物をクローニングすることなくシーケンスする方法（ダイレクト・シーケンス法）も有用な方法である [Corinne Wong et al. (1988) Nature, 330, 384-386]。この方法はライブラリー作製やそのライブラリーのスクリーニングが不要であり、多くのサンプルの配列情報を同時に得られる迅速な方法である。

さらに、本発明者は、PCR 反応系中に残存する未反応のプライマー及び2' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート（2' d N T P s）を除去することなく、かつPCR反応生成物が迅速に再生する問題を回避するため、変性自体を全く行わないで良い、全

く新しい DNA の塩基配列決定方法を提案した [W096/14434]。この方法は、T7 RNA ポリメラーゼ等の RNA ポリメラーゼと RNA 転写反応のターミネーター（例えば、3' デオキシリボヌクレオシド 5' トリフォスフェート、3' dNTPs）を用いるダイレクト転写シーケンス法である。

上記ダイレクト転写シーケンス法は、以下のように行われる。PCR 法等で増幅した DNA を鋳型として、RNA ポリメラーゼをリボヌクレオシド 5' トリフォスフェート類 (NTP) 及びデオキシリボヌクレオチド (3' dNTP) の混合物中で反応させる。この反応において、鋳型の DNA 配列に相応した塩基を有するリボヌクレオチドがリボヌクレオチド配列中に逐次取り込まれ、3' デオキシリボヌクレオチドが取り込まれることでターミネーションが起こりポリリボヌクレオチドが合成される。得られるポリリボヌクレオチド（核酸転写生成物）を分離し、得られる分離分画から核酸の配列を読み取ることで DNA の塩基配列が決定される。特に、核酸転写のターミネーターとして、蛍光標識された 3' dNTP 誘導体を用い、ターミネーターが有する標識を読み取ることで塩基配列を容易に決定できる。

この方法によれば、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅した DNA 生成物の塩基配列を、プライマー及び 2' デオキシリボヌクレオシド 5' トリフォスフェート (2' dNTPs) を除去することなしにそのままシーケンスに使用できる。これは 2' dNTPs が RNA ポリメラーゼの基質として働かないためである。さらに、変性自体を全く行わないため、PCR 生成物が迅速に再生する問題も回

避でき、極めて優れた方法である。

ところで、ヒトゲノムのように膨大な量のゲノムの塩基配列を解析する場合、短期間に結果を得ようとする、現存する方法に比べ桁違いに迅速かつ簡便な方法が必要となる。上記ダイレクト転写シーケンス法は、DNAポリメラーゼを用いる従来のシーケンス法に比べて迅速な方法ではあるが、さらに迅速かつ簡便な方法が必要である。そこで、上記ダイレクト転写シーケンス法を利用し、さらに迅速かつ簡便にシーケンスを行う方法として、ポリメラーゼ連鎖反応によるDNAの増幅とダイレクト転写シーケンス法の核酸転写反応とを同じ反応液中で同時に並行して行うことが考えられる。

ところが、ポリメラーゼ連鎖反応においては、DNA鎖の増幅のために反応液の温度の昇降が必須である。そのため、ポリメラーゼ連鎖反応に使用されるDNAポリメラーゼは高い耐熱性を有するものである。従って、核酸転写反応に用いられるRNAポリメラーゼについても同様に高い耐熱性を有することが要求され、DNAポリメラーゼと同様の耐熱性を有するRNAポリメラーゼが出現すれば、上記組合せ方法は可能となる。しかるに、現在のところそのような耐熱性のRNAポリメラーゼは知られていない。

そこで、本発明の目的は、耐熱性のRNAポリメラーゼを用いることなしに標的DNAの増幅と核酸転写物の生成とを同時並行して行える新たな方法を利用したDNAの塩基配列決定方法を提供することにある。

発明の要約

本発明は、標的DNA断片を増幅させつつ、増幅された標的DNA断片を鋳型としてRNAポリメラーゼにより、核酸転写反応のターミネーターの存在下、核酸転写物を生成させ、生成した核酸転写物を解析することで標的DNA断片の塩基配列を決定する方法であって、上記標的DNA断片の増幅と核酸転写物の生成とを等温下で行うことを特徴とする方法（第1の方法）に関する。

さらに本発明は、(a-1) 標的DNA断片配列を含むDNA断片（但し、このDNA断片は、ニック形成能を有する配列及び少なくとも一方の鎖にRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む）、

(b) 標的DNA断片の一方の鎖に対するプライマー配列及びニック形成能を有する配列を含むプライマー（以下、プライマーG1という）、

(c) 標的DNA断片の他方の鎖に対するプライマー配列及びニック形成能を有する配列を含むプライマー（以下、プライマーG2という）、

（但し、上記プライマーG1及びG2の少なくとも一方はRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む）

(d) dATP、dGTP、dCTP及びdTTP又はそれらの誘導体からなるデオキシリボヌクレオシド5'トリフォスフェート類（以下、dNTP誘導体という）、

(e) ATP、GTP、CTP及びUTP又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5'トリフォスフェート類（以下、NTP誘導体という）、及び

(f) 3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP 及びそれらの誘導体からなる群から選ばれる少なくとも1種の3' デオキシリボヌクレオシド5'トリフォスフェート（以下、3' dNTP 誘導体という）の存在下、

(g) DNAポリメラーゼ、及び

(h) RNAポリメラーゼを作用させ、

かつ上記DNA断片 (a-1) のニック形成能を有する部位にニックを形成させて、

前記標的DNA断片配列を含むDNA断片を増幅しつつ核酸転写生成物を得る工程、及び

得られた核酸転写生成物を分離し、分離分画から核酸の配列を読み取る工程を含むDNAの塩基配列決定方法 (第2の方法) に関する。

さらに本発明は、標的DNA断片に、プライマーB1 (標的DNA断片の一方の鎖に対するプライマー)、プライマーB2 (標的DNA断片の他方の鎖に対するプライマー)、プライマーG1及びプライマーG2をハイブリダイズする工程 (但し、プライマーB1はプライマーG1より、標的DNA断片の一方の鎖の5'側にハイブリダイズし、プライマーB2はプライマーG2より、標的DNA断片の他方の鎖の5'側にハイブリダイズする)

(a-2) ハイブリダイズにより得られた標的DNA断片に、(b) プライマーG1、(c) プライマーG2、(d) dNTP誘導体、(e) NTP誘導体及び(f) 少なくとも1種の3' dNTP誘導体の存在下、

(g) DNAポリメラーゼ、(h) RNAポリメラーゼを作用させ、かつ上記DNA断片 (a-2) のニック形成能を有する部位にニックを形成させて、前記標的DNA断片配列を含むDNA断片を増幅しつつ核酸転写生成物を得る工程、及び

核酸転写生成物を分離し、得られる分離分画から核酸の配列を読み取る工程を含むDNAの塩基配列決定方法 (第3の方法) に関する。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例で得られた塩基配列のエレクトログラムである。

発明を実施するための形態

本発明の方法は、いずれも、大きく分けて、標的DNA断片配列を含むDNA断片を増幅し、かつ増幅されたDNA断片を鋳型として核酸転写生成物を得る工程、及び、得られた核酸転写生成物を分離し、分離分画から核酸の配列を読み取る工程とからなる。

第 1 の方法は、標的DNA断片を増幅させつつ、増幅された標的DNA断片を鋳型としてRNAポリメラーゼにより、核酸転写反応のターミネーターの存在下、核酸転写物を生成させ、生成した核酸転写物を解析することで標的DNA断片の塩基配列を決定する方法である。この方法は、上記標的DNA断片の増幅と核酸転写物の生成とを等温下で行うことを特徴とする。ここで「等温下」とは、反応温度を意図的に上下させることなく、という意味である。標的DNA断片の増幅と核酸転写物の生成とは、常温付近で行うことができ、使用されるRNAポリメラーゼ等の酵素の最適温度を考慮して決定することができる。

標的DNA断片の増幅は、例えば、鎖置換増幅法により行うことができる。鎖置換増幅法についてはNucleic Acids Research, Vol. 20, No. 7, 1691-1696 に記載がある。鎖置換増幅法は、標的DNA断片に、DNAポリメラーゼの基質及び標的DNA断片に対するプライマーの存在下、DNAポリメラーゼ及び制限酵素を作用させる方法である。但し、上記プライマーは、順方向及び逆方向の 1 組あり、いずれも制限酵素によりニックが形成され得る配列を含む。さらに、少な

くとも一方のプライマーは、RNAポリメラーゼのプロモーター配列も含むものである。

また、標的DNA断片を鋳型としてRNAポリメラーゼにより、核酸転写反応のターミネーターの存在下、核酸転写物を生成させ、生成した核酸転写物を解析する方法は、核酸転写反応が、RNAポリメラーゼの基質及び標識されたターミネーターの存在下で行われ、核酸転写物の解析を、核酸転写物に取り込まれた上記標識を検出することにより行う方法であることができる。そのような方法としては、例えば、W096/14434に記載された、T7 RNAポリメラーゼ等のRNAポリメラーゼとRNA転写反応のターミネーター（例えば、3'デオキシリボヌクレオシド5'トリフォスフェート、3' dNTPs）を用いるダイレクト転写シーケンス法を挙げることができる。

第2及び第3の方法は、第1の方法の1実施態様である。

増幅及び核酸転写工程

第2の方法においては、増幅の鋳型として、標的DNA断片配列を含むDNA断片(a-1)を用いるが、このDNA断片は、ニック形成能を有する配列及び少なくとも一方の鎖にRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む。

第3の方法では、増幅の鋳型として標的DNA断片に、プライマーB1、プライマーB2、プライマーG1及びプライマーG2をハイブリダイズしたもの(a-2)を用いる。

「標的DNA断片」は、塩基配列を決定する断片である。標的DNA断片の種類や長さ等には特に制限はない。

「ニック形成能を有する配列」とは、例えば、「ヘミホスホロチオエート部位

またはその類縁部位を含む制限酵素部位」である。「ヘミホスホロチオエート部位を含む制限酵素部位」は、制限酵素部位を構成するヌクレオチドのひとつが α S体（1-チオトリフォスフェート）であるものである。ヘミホスホロチオエート部位を含む制限酵素部位に制限酵素を作用させると、 α S体と相補関係にあるヌクレオチドが切断されてニックを形成する（一方の鎖のみが切断される）。また、制限酵素部位の配列は後述のニック形成のために使用される制限酵素に応じて適宜決定することができる。

「RNAポリメラーゼのためのプロモーター配列」は、後述する核酸転写反応に使用されるRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列である。RNAポリメラーゼのためのプロモーター配列は、用いるRNAポリメラーゼの種類に応じて適宜選択することができる。

上記標的DNA断片配列、ニック形成能を有する配列及びRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含むDNA断片（a-1）は、例えば、以下の方法により調製できる。

プライマーB 1、プライマーB 2、プライマーG 1及びプライマーG 2を標的DNA断片にハイブリダイズする工程、及びハイブリダイズにより得られた標的DNA断片に、dNTP誘導体の存在下、DNAポリメラーゼを作用させる工程からなる方法により調製される。プライマーB 1は、標的DNA断片の一方の鎖に対するプライマーであり、プライマーB 2は、標的DNA断片の他方の鎖に対するプライマーであり、プライマーG 1は、標的DNA断片の一方の鎖に対するプライマー配列及びニック形成能を有する配列を含むプライマーであり、プライマーG 2は、標的DNA断片の他方の鎖に対するプライマー配列及びニック形成能を有する配列を含むプライマーである。但し、プライマーB 1はプライマ

ーG 1より、標的DNA断片の一方の鎖の5'側にハイブリダイズし、プライマーB 2はプライマーG 2より、標的DNA断片の他方の鎖の5'側にハイブリダイズする。

標的DNA断片に対するプライマーのハイブリダイズは、例えば、95℃で4分間熱処理し、徐冷することで行うことができる。尚、プライマーB 1とプライマーG 1では、プライマーB 1が5'の上流に位置するように配列を選択する。さらに、ハイブリダイズ物において、プライマーB 1とプライマーG 1との間には1本鎖の領域が存在するように各プライマーの配列を選択する。同様に、プライマーB 2とプライマーG 2でも、プライマーB 2が5'の上流に位置し、かつハイブリダイズ物において、プライマーB 2とプライマーG 2との間に1本鎖の領域が存在するように各プライマーの配列を選択する。尚、各プライマーは常法により適宜合成することができる。

このようなプライマーB 1とプライマーG 1またはプライマーB 2とプライマーG 2がハイブリダイズした鎖は、dNTP誘導体の存在下、DNAポリメラーゼを作用させることで、鎖置換増幅により増幅される。鎖置換増幅法についてはNucleic Acids Research, Vol. 20, No. 7, 1691-1696に記載がある。さらに上記増幅において、dNTP誘導体のうちの1種に α S体を用いることで、ヘミホスホロチオエート部位を含む制限酵素部位を形成することができる。尚、どのdNTP誘導体を α S体とするかは、制限酵素部位の配列に応じて適宜決定できる。

第3の方法では、増幅の鋳型として標的DNA断片に、プライマーB 1、プライマーB 2、プライマーG 1及びプライマーG 2をハイブリダイズしたDNA

断片 (a-2) を用いる。「標的DNA断片」は、塩基配列を決定する断片である。標的DNA断片の種類や長さ等には特に制限はない。プライマーB1、プライマーB2、プライマーG1及びプライマーG2は上述のとおりであり、プライマーB1とプライマーG1では、プライマーB1が5'の上流に位置するように配列を選択する。さらに、ハイブリダイズ物において、プライマーB1とプライマーG1との間には1本鎖の領域が存在するように各プライマーの配列を選択する。同様に、プライマーB2とプライマーG2でも、プライマーB2が5'の上流に位置し、かつハイブリダイズ物において、プライマーB2とプライマーG2との間に1本鎖の領域が存在するように各プライマーの配列を選択する。尚、各プライマーは常法により適宜合成することができる。標的DNA断片に対するプライマーのハイブリダイズは、例えば、95℃で4分間熱処理し、徐冷することで行うことができる。

第3の方法では、増幅及び核酸転写工程の初期に、ハイブリダイズ物を鋳型として、上記したようにDNAポリメラーゼの作用により、標的DNA断片配列を含むDNA断片（但し、このDNA断片は、ニック形成能を有する配列及び少なくとも一方の鎖にRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む）(a-2) が生成される。

増幅及び核酸転写工程においては、上記 (a-1) または (a-2) 標的DNA断片に、(b) プライマーG1、(c) プライマーG2、(d) dNTP誘導体（但し、dNTP誘導体のうちの1種は α S体である）、(e) NTP誘導体及び(f) 少なくとも1種の3' dNTP誘導体の存在下、(g) DNAポリメラーゼ、及び(h) RNAポリメラーゼを作用させ、かつ上記DNA断片 (a-1) または (a-2) のニック形成能を有する部位にニックを形成させる。この反応は、

温度を昇降させることなく、実質的に等温下で行われる。但し、反応温度は、各酵素の至適温度を考慮して適宜決定される。また、DNA断片(a-1)及び(a-2)へのニックの形成は、制限酵素を用いて行うことができる。制限酵素は、制限酵素部位に存在する、例えば、ヘミホスホロチオエート部位を認識してニックを形成することができる。また、ニック形成能を有する配列は、ヘミホスホロチオエート部位またはその類縁部位を含む制限酵素部位であることができ、その際に使用するdNTP誘導体のうちの1種は α S体またはその類縁化合物である。

上記反応系では、DNAポリメラーゼ、制限酵素及びRNAポリメラーゼによる反応が並列的に行われている。

制限酵素は、(a-1)または(a-2)の標的DNA断片が有するニック形成能を有する配列、例えば、ヘミホスホロチオエート部位を含む制限酵素部位に作用して、断片の制限酵素部位にニックを形成する。一般にヘミホスホロチオエート部位を含む制限酵素部位にこの制限酵素部位を認識する制限酵素を作用させると、片鎖のみにヘミホスホロチオエート部位を有する鎖の相補鎖にニックが形成されることは知られている。本発明においては、プライマー鎖G1及びG2はヘミホスホロチオエートを含まないので、プライマー鎖を含む2本鎖中に存在する制限酵素部位には片鎖のみにヘミホスホロチオエート部位が存在することになり、この制限酵素部位にニックが形成される。しかし、標的DNA断片中に制限酵素部位と同一配列が存在しても、プライマー鎖を含まない部位においては、両鎖中にヘミホスホロチオエート部位が存在することになり、不必要なニックが形成される恐れはない。

尚、実際には制限酵素によりニックの形成のされ易さがことなるので、制限

酵素の性能を考慮して適宜選択することができる。制限酵素としては、Hinc II、BstBI、AvaI等を挙げることができるが、これらに制限されるものではない。尚、制限酵素は市販品を適宜入手できる。

DNAポリメラーゼは、上記制限酵素の作用によりDNA断片に形成されたニックを起点とし、かつニックを有する断片を鋳型として、鎖置換増幅反応を起こし、配列の増幅を行う。その際、dNTP誘導体が基質となる。さらに、ニック形成能を有する配列が、ヘミホスホロチオエート部位を含む制限酵素部位である場合、dNTP誘導体のうちの1種として α S体を用いることで、増幅されるDNA断片の制限酵素部位にヘミホスホロチオエート部位を形成する。dNTP誘導体の α S体は、市販品を適宜入手できる。尚、どのdNTP誘導体を α S体とするかは、制限酵素部位の配列に応じて適宜決定できる。

使用されるDNAポリメラーゼの種類には特に制限はなく、鎖置換増幅反応を起こしやすい種類のDNAポリメラーゼから適宜選択することができる。DNAポリメラーゼとしては、例えば、Bst pol、exeklenow等を挙げることができるが、これらに制限されるものではない。DNAポリメラーゼも市販品を適宜入手できる。

RNAポリメラーゼは、DNAポリメラーゼにより増幅されたDNA断片を鋳型とし、かつ(e)塩基の異なる4種類のNTP誘導体及び(f)少なくとも1種の3' dNTP誘導体を基質として核酸転写生成物を生じる。

転写生成物であるRNA又は核酸の3'末端には、3' dNTP誘導体を取り込まれることにより、3'ヒドロキシ基が欠落し、RNA又は核酸の合成が阻害される。その結果、3'末端が3' dNTP誘導体である種々の長さのRNA又は核酸断片が得られる。塩基の異なる4種類の3' dNTP誘導体につ

いて、それぞれ、このようなデオキシリボヌクレオチド・アナログ体を得る。このデオキシリボヌクレオチド・アナログ体を4通り用意することで、RNA又は核酸配列の決定に用いることができる [Vladimir D. Axelred et al. (1985) Biochemistry Vol. 24, 5716-5723]。配列の決定のための読み取りには、3' dNTP 誘導体が標識を有することが好ましい。3' dNTP 誘導体の標識としては、例えば、蛍光物質または放射性若しくは安定同位元素を挙げることができる。同位元素で標識された3' dNTP 誘導体は市販されており、また標識された3' dNTP 誘導体も公知の方法 [例えば、W096/14434] により合成することができる。

上記核酸転写反応においては、塩基が異なる4種類の3' dNTP 誘導体であって、かつ互いに異なる標識を有する誘導体を用い、得られた核酸転写反応生成物を分離し、得られる分離分画が有する標識から得られるシグナルから核酸の配列を読み取ることが、1回の反応で全ての塩基についての配列を決定できることから好ましい。

但し、1つの核酸転写反応に1種類の3' dNTP 誘導体を用い、異なる4種類の3' dNTP 誘導体を用いて4回核酸転写反応を行い、3' 末端の3' dNTP 誘導体の塩基の異なる4通りの転写生成物を得ることもできるが、効率的ではない。

第2の方法においては、DNA断片 (a-1) の一方の鎖が、ニック形成能を有する配列及びRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含み、プライマーG1及びG2の一方がRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含み (但し、プロモーター配列は、DNA断片 (a-1) に含まれる配列と同一である)、かつ上記プロモーター配列により作動するRNAポリメラーゼを用いて核酸転写の工程を行うことができる。この場合、標的DNA断片いずれか一方の鎖

に配列についてのみ配列の読み取りが行われる。

標的DNA断片の両方の鎖について配列の読み取りを行うこともできる。その場合、DNA断片(a-1)として、両方の鎖が、それぞれニック形成能を有する配列及びRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含むものを用いる。さらに、プライマーG1及びG2として、それぞれがRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含むものを用いる。但し、プライマーG1に含まれるプロモーター配列は、DNA断片(a-1)に含まれる一方のプロモーター配列と同一のものとする。プライマーG2に含まれるプロモーター配列は、DNA断片(a-1)に含まれる他方のプロモーター配列と同一のものとする。そして、核酸転写の工程を含む塩基配列の解析は、上記2種のプロモーター配列のいずれか一方によってのみ作動する2種のRNAポリメラーゼのいずれか一方を用いて行う。異なるRNAポリメラーゼを用いて、核酸転写の工程を含む塩基配列の解析を2回行うことで、標的DNA断片のそれぞれの鎖について解析データが得られる。得られた2種の解析データに基づいて標的DNA断片の塩基配列の決定を行うことができる。この場合、標的DNA断片の両方の鎖について独立に塩基配列の決定を行い、得られた2つの鎖の配列に基づいて配列決定を行うことができ、読み取りの精度を向上させることができるという利点がある。

RNAポリメラーゼは、野性型RNAポリメラーゼ及び変異型RNAポリメラーゼのいずれでも良い。但し、対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3' dNTP 誘導体を取り込む能力を増加させるように、野性型RNAポリメラーゼの少なくとも1つのアミノ酸が修飾されたものである変異型のRNAポリメラーゼであることが好ましい。ここで、「野性型RNAポリメラーゼ」は、天然に存在する全てのRNAポリメラーゼを含み、さらに、及び野性型RNAポ

リメラーゼであって、対応する野性型RNAポリメラーゼの能力と比較して、3' デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの誘導体を取り込む能力を増加させることを目的とする修飾以外のアミノ酸の変異、挿入または欠落を、さらに有するものであることもできる。即ち、野性型RNAポリメラーゼを人為的に上記以外の目的で修飾したRNAポリメラーゼも、上記「野性型RNAポリメラーゼ」に含まれる。但し、そのようなアミノ酸の変異、挿入または欠落は、RNAポリメラーゼとしての活性を維持する範囲で、行われたものであることが適当である。

上記変異型RNAポリメラーゼとしては、例えば、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y 及び L665P/F667Y を挙げることができる。ここで番号は、ポリメラーゼ蛋白質の N 末端からの番号であり、例えば F667 は、このポリメラーゼの 667 番目のアミノ酸残基が F であることを示し、F 667 Y の記述は、667 番目のアミノ酸残基 F を Y に置換させたことを意味する。これらは、RNA 合成活性を充分保持し、さらに 3' dNTPs の取り込み能力が大幅に改善し、野生型で観察された強いバイアスが著しく低下している。

変異型RNAポリメラーゼは、通常の遺伝子組み換え技術を用いて作成することが可能である。また、変異型 T7 RNA ポリメラーゼ F644Y、L665P/F667Y を生産する大腸菌 pT7RF644Y(DH5 α) 及び pT7RL665P/F667Y(DH5 α) は、工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託番号がそれぞれ 5998 号(FERM-BP-5998) 及び 5999 号(FERM-BP-5999) として 1997 年 7 月 2 日に寄託されている。

上記では、標的DNA断片配列を含むDNA断片の増幅と核酸転写反応とを同時並列的に行う系について説明したが、鎖置換増幅法を用いて標的DNA断片配列を含むDNA断片の増幅し、次いで得られたDNA断片を鋳型として核酸転写

反応を行うこともできる。但し、上述のように、DNA断片の増幅と核酸転写反応とを1つの反応容器内で同時並列的に行う方がはるかに簡便かつ効率的である。

核酸転写生成物の分離及び読み取り

本発明の方法では、核酸転写生成物を分離する。この分離は、転写生成物に含まれる分子量の異なる複数の生成物分子を、分子量に応じて分離することができる方法で適宜行うことができる。このような分離方法としては、例えば電気泳動法を挙げることができる。その他にHPLC等も用いることができる。

電気泳動法の条件等には特に制限はなく、常法により行うことができる。転写生成物を電気泳動法に付することにより得られるバンド（核酸ラダー）からRNA又は核酸の配列を読み取ることができる。

RNA又は核酸ラダーの読み取りは、転写物反応において各フラグメントに取り込まれた3' dNTP 誘導体が有する標識を読み取ることにより行うことができる。具体的には、標識された転写生成物を電気泳動に付して得られるバンドの放射性若しくは安定同位元素又は蛍光を検出することで、転写生成物の配列を読み取ることができる。放射性若しくは安定同位元素又は蛍光を発生するラダーの検出は、例えば、DNAシーケンシングに用いている装置を適宜用いて行うことができる。

上記のように読み取られたRNA又は核酸配列から、転写の鋳型として用いられたDNA配列を決定することができる。各塩基について、それぞれラダーを形成した場合には、4種類のラダーから得られたRNA又は核酸配列情報を総合して、転写の鋳型として用いられたDNA配列を決定することができる。また、2種以上の塩基について同時にラダーを形成した場合（同一のラダー内に2種以上

の塩基のバンドが共存する場合) には、各ラダーから得られたRNA又は核酸配列情報を総合して、転写の鋳型として用いられたDNA配列を決定することができる。特に、4種の塩基について同時にラダーを形成した場合(同一のラダー内に4種の塩基のバンドが共存する場合) には、1つのラダーから得られたRNA又は核酸配列情報から、転写の鋳型として用いられたDNA配列を決定することができる。

本発明の方法は、標的DNAの増幅と核酸転写物の生成とを同時並行して行える新たな方法を利用したDNAの塩基配列決定方法である。本発明の方法では、従来は、逐次独立して行っていた標的DNAの増幅と核酸転写物の生成と同時並行して行えるため、これまでの方法に比べて格段に効率的にDNAの塩基配列決定を行なうことができる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに説明する。

変異ガンの診断などに用いられるヒトp53遺伝子の特定部位について、本発明の塩基配列決定方法を適用した。

材料

1) プライマーの作成:

プライマーの作成: 以下に示す資料(1)及び(2)を参考にして、p53エクソン8近傍に4種類のプライマーを作成した。

資料(1) SDAに関するもの

Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J.

G. and Malinowski, D. P. Nucleic Acids Res. 20 (1992) 1691-1696. Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique.

Walker, G. T., Little, M. C. Nadeau, J. G. and Shank, D. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 392-396. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system.

資料 (2) ヒト p 5 3 の塩基配列に関するもの

Buchman, L. L., Chumakov, P. M., Ninkina, N. N., Samarina, O. P. and Georgiev, G. P. Gene 70 (1988) 245-252. A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene.

B1 プライマー : 5' -CCTATCCTGAGTA (13mers, 塩基配列番号 1408-1420)

B2 プライマー : 3' -TGATTCAGAACCC (13mers, 塩基配列番号 1664-1676 と相補)

G1 プライマー :

5' -TCGAATCGTTGTCTCGGGGCATAATACGACTCACTATAGGGCCCAATCTACTGGGAC

(5' 端から最初の下線部 : 制限酵素部位、2 番目の下線部 : T 7 RNA ポリメラーゼプロモーター部位、3 番目の下線部 : 13 塩基 : p53 塩基配列番号 1227-1338 と相補)

G2 プライマー : 3' -TCTTATAAAGTGG GGGCTCTTCAGACCTCGCCTTAGC

(3' 端から最初の下線部 : 13 塩基 : p53 塩基配列番号 1643-1655 と相補、2 番目の下線部 : 制限酵素部位)

2) 酵素

制限酵素 BsoBI : New England Biolab より購入。本酵素は C/PyCGpuG 配列を切

断する。DNAポリメラーゼ(Bst pol) : Epicentre より購入。T7 RNAポリメラーゼ(変異型、F644Y) : 野生型T7 RNAポリメラーゼの667番目のF(フェニルアラニン)残基をY(チロシン)残基に変化させた変異型T7 RNAポリメラーゼ。

3) DNA

ヒト胎盤DNAならびにヒト大腸ガン由来細胞株HT-29(ATCCより入手)を用いた。本ガン細胞株のp53 DNAはエキソン8部位273番目のアミノ酸RがHに変異していることが知られている(G→A変異)(資料(3) Murakami, Y., Hayashi, K., Hirhashi, S. and Sekiya, T. Cancer Res. 51 (1991) 5520-5525. Aberration of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas.

Murakami, Y., Hayashi, K. and Sekiya, T. Cancer Res. 51 (1991) 3356-3361. Detection of aberrations of the p53 alleles and the gene transcript in human tumor cell lines by single-strand conformation polymorphism analysis. 参照)

方法

(1) 下記のを混ぜ合わせ、95℃4分熱変性させ、37℃1分でプライマーのアニーリングを行った。

ヒト胎盤DNAまたはヒトガン細胞株DNA	0.5 μ g/ml	-----	1 μ l
プライマー G1 及び G2(10 μ M)	各々	-----	1 μ l
プライマー B1 及び B2(1 μ M)	各々	-----	1 μ l
dGTP, dATP, dTTP (各々 2mM)		-----	2 μ l
d α SCTP (10 mM)		-----	2 μ l

10Xバッファ*-----2 μ l
 GTP, ATP, UTP, CTP (各々 2mM)-----5 μ l
 水-----1 μ l
 4色蛍光標識ヌクレオチド混液**-----1 μ l

(注: *500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT 液、

**R11C-3' dGTP 1 μ M, R6G-3' dATP 1 μ M, ROX-3' dCTP 50 μ M, TMR-3' dUTP

12.5 μ M の混液、R11C-3' dGTP、R6G-3' dATP、ROX-3' dCTP 及び TMR-3' dUTP

はいずれも蛍光標識した 3' dNTP である)

(2) 上記 (1) に更に次のものを加えて全量を 20 μ l とし、45 °C、2時間反応させた。

制限酵素 BsoBI (10 ユニット/ μ l) -----1 μ l
 DNAポリメラーゼ (Bst pol) 5 ユニット/ μ l-----2 μ l
 T7 RNAポリメラーゼ (F644Y) 25 ユニット/ μ l-----1 μ l

(3) 反応液をシーケンス用ゲル電気泳動法で解析する。

ヒト胎盤DNA (上) 及びヒトガン細胞株HT29 DNA (下) のp53エクソンの一部に対応する塩基配列のエレクトログラムを図1に示す。上の図では273番目アミノ酸がR (CGT) であるのに対して、下ではそれが半分程H (CAT) になっていることがわかる。

本発明の方法では、一度熱変性を行うだけで、後は同一のチューブ・同一の温度で、DNAの増幅から塩基配列の決定まで行うことができる。

請求の範囲

- (1) 標的DNA断片を増幅させつつ、増幅された標的DNA断片を鋳型としてRNAポリメラーゼにより、核酸転写反応のターミネーターの存在下、核酸転写物を生成させ、生成した核酸転写物を解析することで標的DNA断片の塩基配列を決定する方法であって、上記標的DNA断片の増幅と核酸転写物の生成とを等温下で行うことを特徴とする方法。
- (2) 標的DNA断片の増幅と核酸転写物の生成とを、常温付近で行う請求項1に記載の方法。
- (3) 標的DNA断片の増幅を鎖置換増幅法により行う請求項1または2に記載の方法。
- (4) 鎖置換増幅法が、標的DNA断片に、DNAポリメラーゼの基質及び標的DNA断片に対する2種のプライマー（但し、プライマーは制限酵素によりニックが形成され得る配列を有する）の存在下、DNAポリメラーゼ及び制限酵素を作用させる方法である請求項3に記載の方法。
- (5) 2種のプライマーの一方または両方が、制限酵素によりニックが形成され得る配列に加えて、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む請求項4に記載の方法。
- (6) 核酸転写反応が、RNAポリメラーゼの基質及び標識されたターミネーターの存在下で行われ、核酸転写物の解析を、核酸転写物に取り込まれた上記標識を検出することにより行う請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
- (7) (a-1) 標的DNA断片配列を含むDNA断片（但し、このDNA断片は、ニック形成能を有する配列及び少なくとも一方の鎖にRNAポリメラーゼの

ためのプロモーター配列を含む)、

(b) 標的DNA断片の一方の鎖に対するプライマー配列及びニック形成能を有する配列を含むプライマー (以下、プライマーG 1 という)、

(c) 標的DNA断片の他方の鎖に対するプライマー配列及びニック形成能を有する配列を含むプライマー (以下、プライマーG 2 という)、

(但し、上記プライマーG 1 及びG 2 の少なくとも一方はRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含む)

(d) dATP、dGTP、dCTP及びdTTP又はそれらの誘導体からなるデオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート類 (以下、dNTP誘導体という)、

(e) ATP、GTP、CTP及びUTP又はそれらの誘導体からなるリボヌクレオシド5' トリフォスフェート類 (以下、NTP誘導体という)、及び

(f) 3' dATP、3' dGTP、3' dCTP、3' dUTP 及びそれらの誘導体からなる群から選ばれる少なくとも1種の3' デオキシリボヌクレオシド5' トリフォスフェート (以下、3' dNTP誘導体という) の存在下、

(g) DNAポリメラーゼ、及び

(h) RNAポリメラーゼを作用させ、

かつ上記DNA断片 (a-1) のニック形成能を有する部位にニックを形成させて、

前記標的DNA断片配列を含むDNA断片を増幅しつつ核酸転写生成物を得る工程、及び

得られた核酸転写生成物を分離し、分離分画から核酸の配列を読み取る工程を含むDNAの塩基配列決定方法。

(8) DNA断片 (a-1) が、

標的DNA断片の一方の鎖に対するプライマー (以下、プライマーB 1という)、
標的DNA断片の他方の鎖に対するプライマー (以下、プライマーB 2という)、
プライマーG 1及びプライマーG 2を標的DNA断片にハイブリダイズする工程
(但し、プライマーB 1はプライマーG 1より、標的DNA断片の一方の鎖の
5' 側にハイブリダイズし、プライマーB 2はプライマーG 2より、標的DN
A断片の他方の鎖の5' 側にハイブリダイズする)、及び

ハイブリダイズにより得られた標的DNA断片に、dNTP誘導体の存在下、
DNAポリメラーゼを作用させる工程

からなる方法により調製される請求項7に記載の方法。

(9) DNA断片 (a-1) の一方の鎖が、ニック形成能を有する配列及びRNA
Aポリメラーゼのためのプロモーター配列を含み、プライマーG 1及びG 2の一
方がRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含み (但し、プロモーター
配列は、DNA断片 (a-1) に含まれる配列と同一である)、かつ上記プロモ
ーター配列により作動するRNAポリメラーゼを用いて核酸転写の工程を行う請
求項7または8に記載の方法。

(10) DNA断片 (a-1) の両方の鎖が、それぞれニック形成能を有する配
列及びRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含み、プライマーG 1及
びG 2のそれぞれがRNAポリメラーゼのためのプロモーター配列を含み (但し、
プライマーG 1に含まれるプロモーター配列は、DNA断片 (a-1) に含まれ
る一方のプロモーター配列と同一であり、プライマーG 2に含まれるプロモータ
ー配列は、DNA断片 (a-1) に含まれる他方のプロモーター配列と同一であ
る)、かつ上記2種のプロモーター配列のいずれか一方によってのみ作動する2

種のRNAポリメラーゼのいずれか一方を用いて核酸転写の工程を含む塩基配列の解析を、DNA断片(a-1)の両方の鎖のそれぞれについて行い、得られた2種の解析データに基づいて塩基配列の決定を行う請求項7または8に記載の方法。

(11) 標的DNA断片に、プライマーB1、プライマーB2、プライマーG1及びプライマーG2をハイブリダイズする工程、

(a-2) ハイブリダイズにより得られた標的DNA断片に、(b) プライマーG1、(c) プライマーG2、(d) dNTP誘導体、(e) NTP誘導体及び(f) 少なくとも1種の3' dNTP誘導体の存在下、

(g) DNAポリメラーゼ、(h) RNAポリメラーゼを作用させ、かつ上記DNA断片(a-2)のニック形成能を有する部位にニックを形成させて、前記標的DNA断片配列を含むDNA断片を増幅しつつ核酸転写生成物を得る工程、及び

核酸転写生成物を分離し、得られる分離分画から核酸の配列を読み取る工程を含むDNAの塩基配列決定方法。

(12) DNA断片(a-1)及び(a-2)へのニックの形成を、制限酵素を用いて行う請求項7~11のいずれか1項に記載の方法。

(13) ニック形成能を有する部位がヘミホスホロチオエート部位またはその類縁部位を含む制限酵素部位であり、かつdNTP誘導体のうちの1種は α S体またはその類縁化合物である請求項7~12のいずれか1項に記載の方法。

(14) DNA断片を増幅しつつ核酸転写生成物を得る工程が実質的に等温下で行われる請求項7~13に記載の方法。

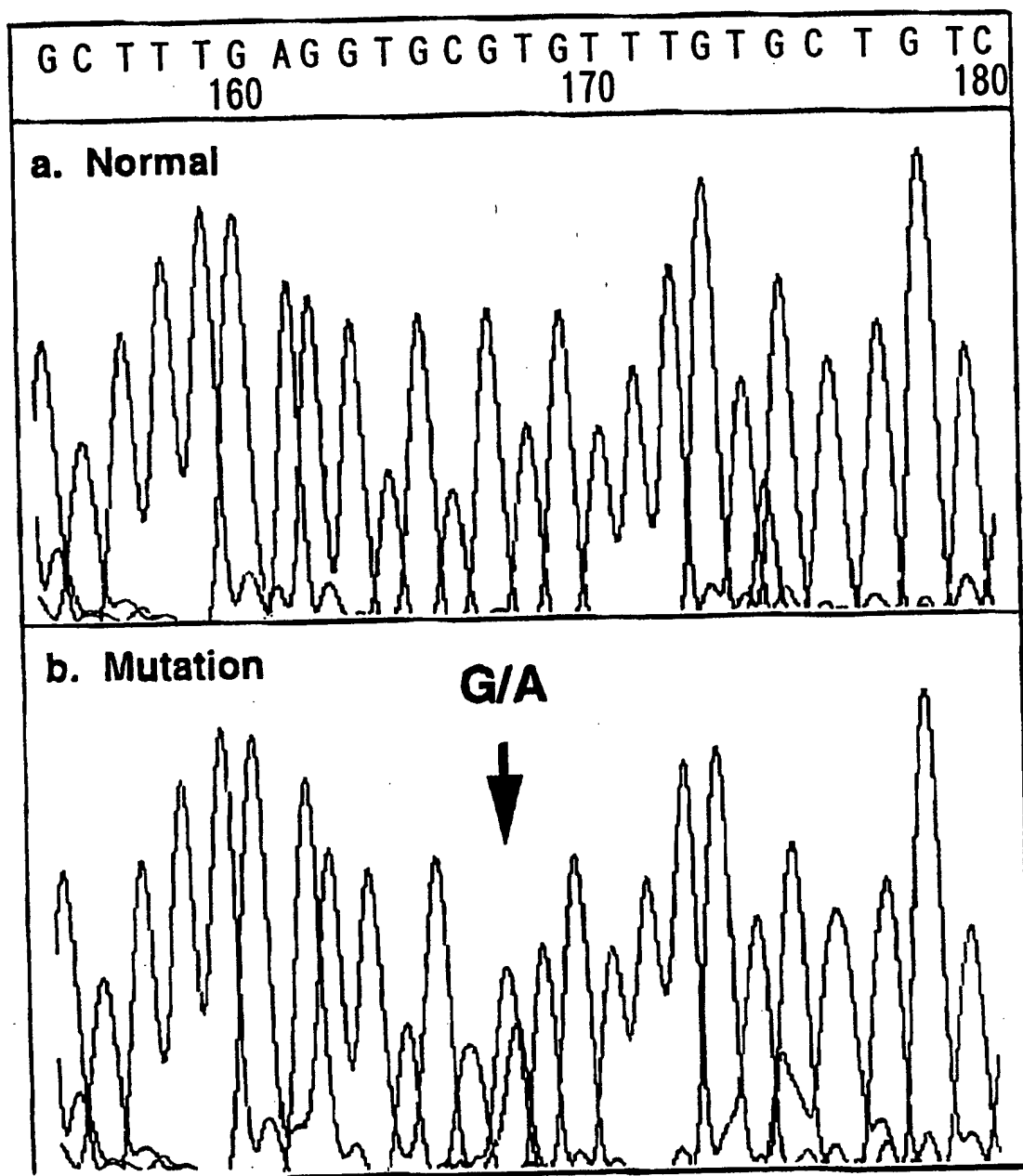
(15) 3' dNTP誘導体が標識を有する請求項7~14のいずれか1項に記載

の方法。

(16) 3' dNTP 誘導体の標識が蛍光物質または放射性若しくは安定同位元素である請求項15に記載の方法。

(17) 核酸転写反応において塩基が異なる4種類の3' dNTP 誘導体であって、かつ互いに異なる標識を有する誘導体を用い、得られた核酸転写反応生成物を分離し、得られる分離分画が有する標識から得られるシグナルから核酸の配列を読み取る請求項7～16のいずれか1項に記載の方法。

☒ 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 96/14434, A (The Institute of Physical and Chemical Research), 17 May, 1996 (17. 05. 96) & EP, 785278, A	1-17
Y	JP, 5-276947, A (Becton, Dickinson and Co.), 26 October, 1993 (26. 10. 93) & EP, 543612, A & US, 5270184, A	1-17
Y	G. TERRANCE WALKER, MELINDA S. FRAISER, JAMES L. SCHRAM, MICHAEL C. LITTLE, JAMES G. NADEAU, DOUGLAS. P. MALINOWSKI, "Strand displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique", Nucleic Acids Research, 1992, Vol. 20, No. 7, P.1691-1696	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 February, 1999 (18. 02. 99)

Date of mailing of the international search report
2 March, 1999 (02. 03. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/00223

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl^o C12Q1/68

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl^o C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)
BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 96/14434, A (理化学研究所) 17. 5月. 1996 (17. 05. 96) & EP, 785278, A	1-17
Y	J P, 5-276947, A (ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー) 26. 10月. 1993 (26. 10. 93) & EP, 543612, A & US, 5270184, A	1-17
Y	G. TERRANCE WALKER, MELINDA S. FRAISER, JAMES L. SCHRAM, MICHAEL C. LITTLE, JAMES G. NADEAU, DOUGLAS P. MALINOWSKI, "Strand displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique", Nucleic Acids Research, 1992, Vol. 20, No. 7, P. 1691-1696	1-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
18. 02. 99

国際調査報告の発送日

02.03.99

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
吉住 和之 印
4 B 9165
電話番号 03-3581-1101 内線 3449

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.